

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学 号: 20120051301987

UDC_____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

Caenorhabditis elegans CDC-42 与 PAR 极性
蛋白之间的相互作用及其对寿命的影响

The Interaction between CDC-42 and PAR Protein and
CDC-42 Affect the Life-span of *Caenorhabditis elegans*

普 凌

指导教师姓名: 杨玉荣 副教授

专 业 名 称: 动 物 学

论文提交日期: 2008 年 06 月

论文答辩时间: 2008 年 07 月

学位授予日期: 2008 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2008 年 07 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2. 不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

目 录

中文摘要.....	1
英文摘要.....	3
第一章 前言.....	5
1.1 简介.....	5
1.2 RNAi 及其作用机制.....	6
1.3 <i>Caenorhabditis elegans</i> 中 CDC-42 和极性蛋白在胚胎中的作用.....	8
1.4 <i>C.elegans</i> 作为模型研究寿命和衰老.....	14
1.5 <i>daf-2</i> 基因.....	15
1.6 <i>daf-16</i> 基因.....	15
1.7 DAF-2/DAF-16 信号通路.....	16
1.8 下游信号调控.....	20
1.9 感觉神经细胞对寿命的调控.....	20
1.10 生殖信号对寿命的调控.....	21
1.11 氧化损害和寿命.....	21
第二章 材料与仪器.....	24
2.1 实验所用材料.....	24
2.2 试剂与培养基的配制.....	25
2.3 主要仪器.....	27
第三章 结果与讨论.....	28
第一节 CDC-42 调控 <i>C.elegans</i> 早期胚胎发育极性以及对 PAR 蛋白定位的影响.....	28
3.1.1 RNA 干扰菌的构建.....	28
3.1.2 结果与分析.....	30
3.1.2.1 <i>cdc-42</i> RNAi 载体构建.....	30
3.1.2.2 对 <i>C.elegans</i> 野生型的 <i>cdc-42</i> RNA 干扰.....	32
3.1.2.3 <i>cdc-42</i> 与 PAR-2 的关系.....	32
3.1.2.4 <i>cdc-42</i> 与 PAR-3 的关系.....	33
3.1.2.5 <i>cdc-42</i> 与 PAR-5 的关系.....	34

3.1.2.6 <i>cdc-42</i> 与 PAR-6 的关系.....	35
3.1.2.7 干扰效率分析.....	36
3.1.3 讨论.....	36
第二节 <i>C.elegans</i> CDC-42 蛋白的原核表达、纯化以及 Western blot 分析.....	38
3.2.1 实验方法.....	38
3.2.2 结果与分析.....	41
3.2.2.1 <i>cdc-42</i> -PET 表达菌的构建.....	41
3.2.2.2 CDC-42 重组蛋白表达条件优化.....	42
3.2.2.3 蛋白纯化.....	43
3.2.2.4 His-tag 检测.....	43
3.2.2.5 抗体效价测定.....	44
3.2.2.6 蛋白浓度测定.....	45
3.2.2.7 Western blot 分析.....	46
3.2.3 讨论.....	47
第三节 CDC-42 在野生型和 <i>par</i> 突变体胚胎中的分布.....	49
3.3.1 实验方法.....	49
3.3.2 结果.....	49
3.3.2.1 CDC-42 在野生型 N2) 胚胎中的表达.....	49
3.3.2.2 CDC-42 在 <i>par-1</i> 突变体 (KK288) 胚胎中的表达.....	51
3.3.2.3 CDC-42 在 <i>par-2</i> 突变体 (KK114) 胚胎中的表达.....	52
3.3.2.4 CDC-42 在 <i>par-3</i> 突变体 (KK237) 胚胎中的表达.....	53
3.3.2.5 CDC-42 在 <i>par-4</i> 突变体 (KK300) 胚胎中的表达.....	54
3.3.2.6 CDC-42 在 <i>par-5</i> 突变体 (KK299) 胚胎中的表达.....	55
3.3.2.7 CDC-42 在 <i>par-6</i> 突变体 (KK818) 胚胎中的表达.....	56
3.3.2.8 CDC-42 在 N2 和 <i>par</i> 突变体胚胎中的中的表达量比较.....	57
3.3.3 讨论.....	57
第四节 <i>cdc-42</i> 对 <i>daf-2</i> 和 <i>daf-16</i> 突变体线虫寿命的影响.....	59
3.4.1 寿命研究方法.....	59
3.4.2 结果.....	60

3.4.2.1 <i>cdc-42</i> RNAi 后对 <i>C.elegans</i> 虫体寿命的影响.....	60
3.4.2.2 Western blot 检测 CDC-42 在 <i>daf-16</i> (-) 和 <i>daf-2</i> (-) 突变体中的分布...	64
3.4.2.3 <i>cdc-42</i> RNAi 后 DAF-16::GFP, SOD-3::GFP 变化情况.....	64
3.4.2.4 <i>daf-2</i> 、 <i>daf-16</i> 突变体胚胎中 CDC-42 的表达.....	66
3.4.3 讨论.....	68
第五节 免疫共沉淀研究 CDC-42 相互作用的蛋白.....	70
3.5.1 实验方法.....	70
3.5.2 结果与分析.....	72
3.5.2.1 单向 SDS-PAGE 结果.....	72
3.5.2.2 质谱分析及检索结果.....	74
3.5.3 讨论.....	79
总结.....	80
参考文献.....	81

TABLE OF CONTENTS

ABSTRACT IN CHINESE	1
ABSTRACT IN ENGLISH.....	3
CHAPTER 1 Introduction	5
1.1 Brief introduction.....	5
1.2 RNAi and its mechanism.....	6
1.3 Function of polarity protein and CDC-42 in <i>Caenorhabditis elegans</i> embryo.....	8
1.4 <i>C.elegans</i> as a model animal to study the life-span and ageing.....	14
1.5 <i>daf-2</i> in lifespan of <i>C.elegans</i>	15
1.6 <i>daf-16</i> in lifespan of <i>C.elegans</i>	15
1.7 DAF-2/DAF-16 pathway.....	16
1.8 Downstream signal regulation.....	20
1.9 Regulation of life span by sensory neurons.....	20
1.10 Regulation of life span by reproductive signals.....	21
1.11 Oxidative damage and ageing.....	21
CHAPTER 2 Materials and instruments.....	24
2.1 Materials.....	24
2.2 Reagents.....	25
2.3 Instruments.....	27
CHAPTER 3 Results and discussion.....	28
3.1 CDC-42 control <i>C.elegans</i> early embryonic development and the localization of PAR proteins.....	28
3.1.1 Construction of <i>cdc-42</i> RNA interference vector.....	28
3.1.2 Results and analysis.....	30
3.1.2.1 Construction <i>cdc-42</i> RNAi vector.....	30
3.1.2.2 <i>cdc-42</i> RNAi on N2.....	32
3.1.2.3 The relationship between <i>cdc-42</i> and PAR-2.....	32
3.1.2.4 The relationship between <i>cdc-42</i> and PAR-3.....	33

3.1.2.5 The relationship between <i>cdc-42</i> and PAR-5.....	34
3.1.2.6 The relationship between <i>cdc-42</i> and PAR-6.....	35
3.1.2.7 Interference rates of <i>cdc-42</i> RNAi.....	36
3.1.3 Discussion.....	36
3.2 CDC-42 and Western blot analysis expression and purification	38
3.2.1 Experimental methods.....	38
3.2.2 Results and analysis.....	41
3.2.2.1 Construction of expression vector <i>cdc-42</i> -PET.....	41
3.2.2.2 The expression of recombinant protein CDC-42	42
3.2.2.3 Protein purification.....	43
3.2.2.4 His-tag detection.....	43
3.2.2.5 Antibody titers detection.....	44
3.2.2.6 Concentration of protein.....	45
3.2.2.7 Western blot analysis.....	46
3.2.3 Discussion.....	47
3.3 The distribution of CDC-42 in the embryo of wild-type and <i>par</i> mutants.....	49
3.3.1 Experimental methods.....	49
3.3.2 Results.....	49
3.3.2.1 CDC-42 in N2 embryo.....	49
3.3.2.2 CDC-42 in <i>par-1</i> (-) embryo.....	51
3.3.2.3 CDC-42 in <i>par-2</i> (-) embryo.....	52
3.3.2.4 CDC-42 in <i>par-3</i> (-)embryo.....	53
3.3.2.5 CDC-42 in <i>par-4</i> (-) embryo.....	54
3.3.2.6 CDC-42 in <i>par-5</i> (-) embryo.....	55
3.3.2.7 CDC-42 in <i>par-6</i> (-) embryo.....	56
3.3.2.8 Comparing the expression of CDC-42 in N2 and <i>par</i> mutants.....	57
3.3.3 Discussion.....	57
3.4 <i>cdc-42</i> affects the life-span of <i>daf-2</i> and <i>daf-16</i> mutants.....	59
3.4.1 Life-span analysis Methods.....	59
3.4.2 Results.....	60

3.4.2.1 The life-span of <i>daf-2</i> and <i>daf-16</i> mutants shortened after <i>cdc-42</i> RNAi.....	60
3.4.2.2 Western blot detect CDC-42 in <i>daf-16</i> (-) and <i>daf-2</i> (-).....	64
3.4.2.3 The change of DAF-16GFP, SOD-3GFP after <i>cdc-42</i> RNAi.....	64
3.4.2.4 CDC-42 expression in <i>daf-2</i> (-) and <i>daf-16</i> (-) mutants embryo.....	66
3.4.3 Discussion.....	68
3.5 The study of proteins interacting with CDC-42 by Co-immunoprecipitation.....	70
3.5.1 Experimental methods.....	70
3.5.2 Results and analysis.....	72
3.5.2.1 Results of SDS-PAGE.....	72
3.5.2.2 MS analysis and retrieval results.....	74
3.5.3 Discussion.....	79
Summary.....	80
REFERENCES.....	81

摘要

CDC-42 属于 Rho 家族中的类 Ras GTP 酶成员。本文通过 RNA 干扰、CDC-42 的表达与纯化、免疫定位、寿命检测和免疫共沉淀这 5 个方面, 利用模式生物 *C.elegans* 对 *cdc-42* 的定位及其功能进行了研究。

通过干扰之后我们发现 *cdc-42* 对于早期胚胎细胞分裂的极性有一定影响。并且能够调控 PAR-2 和 PAR-6 的定位, 有可能调控 PAR-3 定位, 对 PAR-5 没有影响。

利用 PET 表达了重组 CDC-42, 我们对其表达条件进行了优化, 并大量表达、纯化了 CDC-42, 免疫小鼠得到抗血清, 检测效价, 在野生型和 *par* 突变体虫体中利用 Western blot 检测了 CDC-42 的含量, 发现在 *par-4* 突变体中 CDC-42 表达减少, 其它突变体中也有变化。

通过对 CDC-42 在野生型和 *par* 突变体胚胎中的免疫定位研究, 发现在野生型胚胎 1 细胞时期精核和卵核还没融合时, CDC-42 均匀的分布在细胞质中。到了 2、4 细胞时期, CDC-42 依然均匀的分布在细胞质中。前期染色较为明亮。后期胚胎细胞中, CDC-42 在外周细胞中表达较多。在快形成虫体时, CDC-42 在外周皮层富集。在 *par* 基因突变后, CDC-42 在胚胎中的表达量都有所下降。在 *par-2* 突变体 (KK114) 和 *par-6* 突变体 (KK818) 胚胎中表现的尤为明显, 证明 *par-2* 和 *par-6* 可以调控 *cdc-42*。 *par-1* 突变体 (KK288) 中 CDC-42 的表达减少但一直维持恒定, 表明 *par-1* 对 *cdc-42* 的影响是持续的, 并且不可恢复。在 *par-3* 突变体 (KK237)、 *par-4* 突变体 (KK300)、 *par-5* 突变体 (KK299) 胚胎中, CDC-42 的表达量初期很少, 但随着胚胎细胞数目增加, 表达量也出现恢复。意味着它们可能只是间接影响 CDC-42 的表达。

利用 *cdc-42* 的 RNA 干扰食物对 *C.elegans* 进行干扰并检测其寿命, 发现野生型虫体 *cdc-42* RNA 干扰后寿命没有显著性变化, 说明干扰 *cdc-42* 对野生型线虫的寿命没有影响。 *daf-2* 突变体线虫在 *cdc-42* RNA 干扰后平均寿命缩短 2.9 天, 缩短了 23.8%。 *daf-16* 突变体线虫在 *cdc-42* RNA 干扰后寿命相对突变体平均寿命缩短 0.75 天, 说明喂食 *cdc-42* RNA 干扰食物可以有效缩短 *daf-16* 突变体的平均寿命, 平均寿命缩短 10%。与野生型寿命相比较, *daf-2* 突变情况下寿命有所

延长,而在 *daf-16* 突变下寿命会变短。*cdc-42* 干扰后,虽然野生型寿命没有改变,但 *daf-2* 和 *daf-16* 突变体寿命明显缩短。两个突变体的平均寿命在 *cdc-42* RNA 干扰下都有所减少,意味着 *cdc-42* 对寿命影响依赖于 *daf-2* 的胰岛素/IGF-1 信号通路。

对*cdc-42* 进行免疫共沉淀研究,并利用质谱分析得出了大量的可能与之相互作用的蛋白。这些蛋白中包括,产卵缺陷家族成员,蛇型受体U家族成员, *nanos* 相关基因家族成员和很多猜想蛋白。

关键词: *Caenorhabditis elegans*; *cdc-42*; 免疫染色; 寿命; 免疫共沉淀

THE INTERACTION BETWEEN CDC-42 AND PAR PROTEIN AND CDC-42 AFFECT THE LIFE-SPAN OF *CAENORHABDITIS ELEGANS*

ABSTRACT

Rho-family GTPase play an important role in the development. *cdc-42* is a member of small GTPase family. It gets involved in many processes of development. Through *cdc-42* RNAi, CDC-42 expression and purification, immunostaining, life-span analysis and Co-Immunoprecipitation, we study the interaction of CDC-42 with polarity gene and *daf-2*, *daf-16*.

After *cdc-42*(RNAi), the division of *C.elegans* one-cell embryo changed. CDC-42 can regulate the location of PAR-2 and PAR-6. CDC-42 may control the position of PAR-3 and has no effect on PAR-5.

After expression of recombinant CDC-42, optimized the expressing condition and purification, immune the mouse to get CDC-42 antibody, we detect the quantity of CDC-42 on N2 and *par* mutants by Western blot. The results show CDC-42 expressing decreased in *par-4* mutant. After *cdc-42*(RNAi), the quantity of CDC-42 is decreased in N2 worm.

Through the immunostaining of CDC-42 antibody on *C.elegans* wild type and *par* mutants, the results show that CDC-42 distributed intensely in the cytoplasm of one cell embryo in wild type. The distribution of CDC-42 became enriched in the cortex of the late embryo till to the morphogenesis. The expressing of CDC-42 in *par-2*(-) and *par-6*(-) mutants decreased significantly. It implied *par-2* and *par-6* may regulate CDC-42 expressing. In *par-1* mutant, the expressing of CDC-42 decreased till to the morphogenesis. It implied that *par-1* can regulate CDC-42 expressing. In *par-3*(-), *par-4*(-) and *par-5*(-) mutants, CDC-42 expressing is increased with the cell number increased in the embryo. At the morphogenesis stage, the quantity of CDC-42 recovered proved that *par-3*, *par-4* and *par-5* may affect CDC-42 indirectly.

To test the life-span of *C.elegans* after *cdc-42*(RNAi), the results show that *cdc-42* does not effect the life-span of wild type N2 worm. But in *daf-2* mutant, knock down *cdc-42*, the mean life-span of *daf-2* mutant worms shortened 2.9 days. And in *daf-16* mutant, knock down *cdc-42*, the mean life-span of *daf-16* mutant shortened 0.75 day. Compared *daf-2*(-) and *daf-16*(-) with N2, the life-span of *daf-2* mutant is extended and *daf-16* mutant is shortened. With *cdc-42*(RNAi), the life-span of *daf-2*(-) and *daf-16*(-) are both shortened, it implied that *cdc-42* can effect the life-span of *C.elegans* depend on Insulin/IGF-1 pathway.

Using CDC-42 antibody via Co-Immunoprecipitation in wild type N2 and *par* mutants, and combined with MALDI-TOF anslysis, it proved a lot of molecules may interact with CDC-42. These proteins include M110.3; hypothetical protein Y87G2A.f; Egg Laying defective family member (*egl-4*); Serpentine Receptor, class U family member (*sru-12*); F58B3.7; D2063.2; NanOS related family member (*nos-3*); *C. elegans* protein C27H2.2c.

Key words: *Caenorhabditis elegans*; *cdc-42*; immunostaining; life-span; Co-Immunoprecipitation

第一章 前言

1.1 简介

秀丽小杆线虫(*Caenorhabditis elegans*, *C.elegans*)属于小杆亚纲(*Rhabditia*)、小杆目(*Rhabditida*)、小杆总科(*Rhabditoidea*)，是一种常见的、自由生活的小型土壤线虫，在世界的许多地方都有分布，以细菌为食，在理想的条件下生命周期大约为 3 周。*C.elegans* 成体长约 1-1.5 毫米，身体直径约 70 微米，全身共有 959 个细胞。目前，秀丽小杆线虫已经成为现代发育生物学、遗传学和基因组学研究的重要模式材料。野生型线虫胚胎发育中细胞分裂和细胞系的形成具有高度的程序性，这样就便于对其发育进行遗传学分析。由一个受精卵发育成为成熟的成体只要二天多一点(25℃时需 52 小时)。从卵到成体每个细胞的命运以及它们沿着一定的程序，在特定时间的分裂和迁移都已十分清楚。

*C.elegans*有一对性染色体和 5 对常染色体，是一个染色体数很少的二倍体($2n=12$)，其基因组也很小，仅有 8×10^7 bp，约为人类基因组的 3%，约有 13500 个基因。在真核生物中基因都是产生单顺反子 mRNA，但唯有 *C.elegans* 与原核相似，有 25% 左右的基因产生多顺反子 mRNA (Polycistronic mRNA)，通过反式剪接使下游基因表达。*C.elegans* 基因组中非重复序列很高，达到 83%，而高等的真核生物都在 50% 以下，*E.coli* 为 100%，*C.elegans* 在这些特点上都较接近原核生物，这也反映其在进化中的地位较为原始。这种蠕虫大部分是 XX 型，是可以自体受精的两性体 (hermaphrodites)，大约每 500 个蠕虫有 1 个是 XO 型的雄体，此是染色体不分离的结果。

作为实验研究用的通常是 *C.elegans* wild type var. *Bristol* (strain N2)。幼虫孵化和发育经过 4 个幼虫阶段，其间由蜕皮所间断。第四次蜕皮后的成熟成体繁殖大约 4 天，然后再继续生活 10-15 天。线虫生活在土壤间水层，所以在实验室中极易培养。又因为全身透明，研究时不需染色，即可在显微镜下看到线虫体内的器官如肠道、生殖腺等；若使用高倍相差显微镜，还可达到单一细胞的分辨率。

2002 年诺贝尔生理学或医学奖授予悉尼·布雷内等三人，他们获奖的原因是在 20 世纪 60 年代初期正确选择线虫作为模式生物，发现器官发育和“程序性细胞死亡”过程中的基因规则。布雷内是分子生物学的奠基者之一，他在 1965 年第

一次研究线虫，直到 1974 年才发表第一篇有关论文，其中经历了长达 10 年左右默默无闻的基础研究工作时间。直到 20 世纪 80 年代后，线虫研究才逐渐受到国际认可，目前一些国家的科学家已经开始利用布雷内三人的成果，研究可以治疗多种疾病的新方法。

1.2 RNAi 及其作用机制

RNAi 及其遗传机制的发现是 *C.elegans* 对当代生命科学发展的又一重要贡献。RNAi 现象的发现始于三十多年前，当时人们发现反义 RNA 可以抑制内源性 mRNA，并认为这是由于反义 RNA 与 mRNA 互补形成双链 RNA 干扰了 mRNA 的表达。但真正开始 RNAi 的研究却始于转基因植物中的一个发现。1990 年，Napoli 等^[1]为了加深矮牵牛的紫色，用强启动子引入一个色素基因，结果发现出现了色彩斑驳，甚至白色的花，内源性的 mRNA 水平也下降了，这种现象被称为共抑制(co-suppression)。后来在多种植物及真菌中都发现了共抑制现象，但其原因令人困惑。1995 年，Guo 和 Kempthorne^[2]在利用反义 RNA 来抑制线虫 *par-1* 基因的表达时，注意到作为对照的正义 RNA 也可以抑制基因的表达，他们认为这可能是由于当中有部分的反义 RNA 的污染所致。虽然文章发表在当年的 Cell 上，却遗憾地错过了生命科学史上的一个重大发现。1998 年，Fire 等^[3]将正义和反义 RNA 的混合物注射到 *C.elegans* 中，发现其对内源基因的抑制效果比注射单链正义或反义 RNA 还要显著，因而作出了双链 RNA 是基因沉默的诱因这一论断；他们提出了 RNA 干扰这一概念。Fire 等的发现具有划时代意义，不仅为降低或沉默生物体内特定基因的表达提供了一种简单而有效的方法，而且为治疗基因表达失调导致的多种疾病提供了一种可能的治疗手段。2006 年 Fire 和 Mello 获得诺贝尔医学奖。

之后，科学家们相继在植物中发现了 siRNA^[4]，在果蝇培养 S2 细胞中发现了 Dicer^[5] 及 RISC 复合体^[6]。现已发现，外源双链 RNA(或由体内异源 DNA 产生的双链 RNA) 进入生物体后，先被 RNA 酶 Dicer 切割成长度为 21—25 个碱基的双链 RNA。这种小分子 RNA 被称为 siRNA (small interfering RNA)。随后双链 siRNA 与其他一些蛋白形成 RISC 复合体 (RNA induced silencing complex)。在复合体中，siRNA 的一条链 (anti-guide strand) 被 Argonaute 蛋白 AGO-2 降解；另一条链 (guide strand) 则与靶 mRNA 通过碱基配对结合，从而引导 AGO-2 识别并降解靶 mRNA，

造成基因沉默^[7, 8]。剪切双链RNA前体的Dicer是一个进化上非常保守的RNAaseIII家族成员, *C.elegans*只有一种Dicer即DCR-1。而RISC复合体的主要成分是Argonaute蛋白, 也是进化上十分保守的蛋白家族成员。线虫的Argonaute蛋白RDE-1 和RDE-4 类似于果蝇的相应蛋白AGO-1 和AGO-2。AGO-2 是果蝇RISC中的惟一成分, 并且具有RNA 内切酶活性^[9]。在RNA 干扰时, RDE-1 和RDE-4 对于亲代虫体RNA 干扰非常重要, 但在子代中并不是必需的。在*rde-1* 突变体中, RNA干扰不能产生^[10]。RDE-4 可能在识别双链RNA并将其传递给Dicer而形成siRNA 的过程中发挥作用; 而RDE-1 则可能识别siRNA, 并与其他蛋白一起形成RISC复合体。除了siRNA之外, 真核生物体内还存在一类内源性的小RNA, 在细胞的多种生命活动中起着重要作用, 这就是miRNA。

miRNA 及其作用机制的研究是当前生命科学领域的研究热点之一。第一个miRNA基因*lin-4* 也是在*C.elegans*中发现的^[11]。*lin-4* 是一个转录后形成 61bp和22bp的时序调控基因, 它的突变体不能从第一期幼虫进入第二期。其中 22bp的RNA分子通过与*lin-14* 的mRNA互补配对, 从而抑制LIN-14 蛋白的翻译, 进而影响发育进程。当时人们认为这可能只是一个特例而已, 并没有引起太大的轰动。直到Ruvkun实验室发现了线虫的第二个miRNA基因*let-7* 后^[12], 人们才认识到了miRNA的重要性。

miRNA形成的分子机制与siRNA非常相似^[13], 不同之处在于前者来源于基因组中的内源基因转录所形成的发夹状RNA前体。与RNAi相似, miRNA 被认为是多细胞生物基因表达调控的一种普遍方式。以前人们认为动物细胞的 miRNA只抑制靶mRNA的翻译, 不会引起mRNA的降解。最近的研究发现, *C.elegans*的miRNA *lin-4* 和*let-7* 也可以降解各自的靶基因的mRNA^[14]。因此, miRNA可通过降解mRNA来调控基因表达。RNAi及miRNA的发现为疾病治疗提供了潜在的新手段。如用针对癌蛋白BCR/ABL融合位点的双链RNA转染K562 白血病细胞, 可以降低细胞内BCR/ABL 融合基因mRNA 的表达量, 并诱导大量细胞凋亡^[15]。另外RNA干扰在抗病毒侵染方面具有很大的应用前景。已有研究表明, siRNA可以有效抑制HIV-1 在培养细胞中的复制^[16]。

*C.elegans*为研究对象的实验室都在通过全基因组范围的RNAi筛选来寻找新的功能基因。比如, Ruvkun实验室通过RNAi筛选, 找到了 400 多个与脂肪代谢

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库